

人脐带间充质细胞与骨肌系统组织工程

张永兴 单治 赵庆华

摘要 人脐带间充质细胞(hUCMSC)具有廉价易得、无伦理学争议及可在体外扩增等特性,在体外适宜条件下可分化为多种不同细胞谱系,在动物模型体内表现出良好的分化能力及与受体组织器官免疫兼容性,甚至可用于异种移植。近年随着骨肌系统疾病日益增多,将hUCMSC用于骨肌系构建受到关注,一系列体内外实验旨在研究其成骨、成软骨、成肌分化能力以及培养基质、细胞因子、外界刺激、复合材料等的影响,并与骨髓间充质细胞作系列对比。该文就hUCMSC在骨肌系统中的应用研究进展作一综述。

关键词 骨肌系统;脐带间充质细胞;组织工程

DOI doi:10.3969/j.issn.1673-7083.2013.01.020

组织构建研究中理想的种子细胞应具有多分化潜能、廉价易得、无免疫排斥性、无伦理学争议及可在体外扩增等特性。胚胎干细胞(ESC)可分化成所有种类细胞,强大的扩增能力使其产生用于组织构建中的终末分化细胞的数量在理论上是无限的,然而其临床应用却受到伦理道德及不良反应方面的约束。成人骨髓间充质细胞(BMSC)是最广泛应用于组织构建研究的间充质干细胞,具有在体内外分化为软骨组织、骨组织和脂肪组织的能力,且自体来源避免了潜在的免疫排斥反应;第一例利用组织构建治疗骨缺陷的临床研究采用的即为自体BMSC^[1],重建骨在7年内具有良好的稳定性;但是,数量少、增殖能力弱和随时间推移分化潜能显著降低则限制BMSC应用。近年研究发现,人体脐带间充质可作为间充质细胞的来源^[2],具有分化为3个胚层细胞的能力,而其他来源间充质细胞的分化和增殖能力相对较差^[3-5]。

目前已可通过酶解、非酶解等多种方法从脐带组织中分离出间充质细胞^[6]。人脐带间充质细胞(hUCMSC)在形态学上类似于成纤维细胞,作为一种胚外细胞来源,比成人体内干细胞有更快的增殖速度。细胞采集之后,hUCMSC经过7次传代仍保持分化潜能。hUCMSC表现为既非造血细胞表型,又非内皮细胞表型(CD34阴性)的黏附性细胞群落,表达与成人体内间充质细胞类似的细胞表面标记分子如CD10、CD13、CD29、CD49e、CD51、CD73/SH3、CD90(Thy-1)、CD105/SH2、CD106、CD117、CD166和HLA-1/HLA-ABC,而类似于造血细胞表面的标记分子如CD14、CD31、CD34、CD38、CD45和HLA-DR表达呈阴性。此外,hUCMSC还可低水平表达转录因子Oct-4、Nanog和SOX-2等,可根据微RNA和mRNA序列分析进行鉴别^[7]。有报道显示,hUCMSC可分化为所有三个胚层中的细胞谱系^[2],且在移植时不易导致畸胎瘤发生^[8]。

1 hUCMSC 软骨分化能力与影响因素研究

软骨可承担与传递重力,但损伤后的自我再生能力极为有限。现有的微创治疗、人工假体植入等手段均难以重建软骨组织结构,相比之下组织构建是更为有效的

治疗方法。然而,成熟软骨细胞单层扩展的增殖方式使其难以应用于组织构建。

三维构建中,在聚乙二醇酸(PGA)组成的支架环境及转化生长因子(TGF)- β 的刺激下,hUCMSC同样能够分化为成软骨细胞谱系^[9]。研究表明,hUCMSC分化为成软骨细胞的能力是由一种软骨形成关键基因调节因子SOX-9的上调引起,并由相应mRNA转录调节^[10]。阿尔新蓝着色的黏多糖和免疫组织化学技术鉴别出的II型胶原,可作为蛋白质表达水平验证细胞具有向成软骨细胞分化能力的指标^[11]。Karahuseyinoglu等^[2]实验研究显示,经TGF- β 诱导的hUCMSC可表达黏多糖和II型胶原,而对照组中未检测到II型胶原。研究^[12-15]显示,hBMSC和hUCMSC实验中均检测到I型胶原,但hUCMSC组比hBMSC组有更大的胶原颗粒,这可能是因为前者拥有更好的细胞外基质;经“全方位”对比后发现,hUCMSC能合成更多胶原和黏多糖,而hBMSC在细胞外基质的生物合成方面更具优势,无论在II型胶原基因表达水平还是在蛋白质合成水平上均要高于hUCMSC,在分化为成软骨细胞谱系方面似乎优势明显。Singh等^[16]尝试采用基于微环境的培养支架代替基于微颗粒的培养支架,即将特殊形状的大孔培养基与二氧化碳聚合物结合,用于软骨组织构建。hUCMSC比hBMSC有更好的分化能力,能在三维立体培养基中产生I型胶原和II型胶原等优点,使研究者考虑将其用作纤维软骨组织构建中的间充质细胞来源,并应用于颞下颌关节盘、椎间盘及膝关节半月板的构建。

hUCMSC在骨肌系统构建中的首次应用是在一次检测其在活体颞下颌关节重建中分化成颞下颌髁软骨能力的对比实验^[9]。该实验中各组细胞均培养在PGA介质中4周,hUCMSC形成了类似自体颞下颌软骨的纤维软骨样组织,并分化出超过预期数量的颞下颌软骨细胞,这些细胞与自体颞下颌软骨纤维软骨细胞有高度一致的细胞结构,且表现出更强的胶原和黏多糖的生物合成能力。hUCMSC可大量获得并有较高的生物合成能力,被视为理想的颞下颌关节软骨构建材料。

在一项有关细胞接种密度对细胞增殖分化和基质生物合成影响的研究^[17]中,将hUCMSC分别以500万细胞/ml(低)、2500万细胞/ml(中)和5000万细胞/ml(高)等3种不同密度接种于PGA支架上培养,4周后高密度

组和中密度组细胞数量和单个集落、单个细胞细胞外基质合成量均高于低密度组;更重要的是,高密度组和中密度组集落可保持更好的力学完整性;因此推荐在有关纤维软骨组织构建实验中,采用 >2500 万细胞/ml的接种密度。总之,同时含有I型、II型胶原和蛋白聚糖的纤维软骨样组织形成表明,hUCMSC可分化为纤维软骨细胞谱系,并可作为极好的纤维软骨再生的潜在细胞来源。通过生物活性信号分子(如生长因子和蛋白聚糖)、氧张力、共同培养物、力学刺激和体内调节因子等的调节进一步优化成软骨细胞分化环境,增强软骨细胞形成能力,将是未来hUCMSC用于透明软骨组织构建研究的主要方向。

2 hUCMSC 成骨分化机制与复合材料研究

骨组织是一种可以血管化的组织,有天生固有的自我修复和重建能力。尽管骨缺陷可以用骨移植方法来治疗,但该方法受移植产生的不良反应、畸形及感染等诸多不利因素的限制,且对于一些严重骨损伤,目前仍没有令人满意的治疗方法。作为一种组织构建方法,BMSC可以加入生物材料中直接移植,且不需在体外成骨基质中预培养。典型的成骨基质包括成骨信号分子——地塞米松和(或)骨形态发生蛋白(BMP)-2,以及用于基质合成的 β -甘油磷酸和抗坏血酸。重组人BMP-2(rhBMP-2)也具有同样功效^[18]。hUCMSC在平面培养中可在地塞米松和 β -甘油磷酸环境中诱导分化骨原细胞^[11,19]。在诱导分化产生骨原细胞过程中,重要成骨基因Runx相关转录因子(Runx)2及其骨钙蛋白表达的转录共激活因子(TAZ)均被激活^[6],骨钙蛋白、骨桥蛋白基因被上调,同时碱性磷酸酶(ALP)表达活跃^[11,19],具有骨组织特异性的骨黏连蛋白、骨钙蛋白和骨唾液酸糖蛋白的免疫染色均为阳性^[2]。与hBMSC相同,hUCMSC诱导2周之后也可观察到矿化作用,但在形成更大骨结节方面,hUCMSC产生的矿化作用弱于hBMSC。

在三维生物材料中,hUCMSC同样可表现出成骨分化能力,如Runx2上调、骨黏连蛋白合成增加,并可检测到矿化作用^[20]。研究发现,在无纺网状物支架(如PGA)上,以2500万细胞/ml或以上接种密度的效果更好,且在规定条件下合成代谢基质的效果不如成骨基质^[21]。在小鼠模型体内同样可检测到hUCMSC成骨分化能力;比起hBMSC,皮下移植hUCMSC2个月后经von Kossa染色和微CT技术可检测到异位骨和初级骨形成;将hUCMSC接种到多孔仿生骨支架材料(纳米羟基磷灰石-胶原-多聚L-乳酸复合材料)并移植到裸鼠皮下,12周后经透射电镜可检测到成骨细胞^[22]。然而,目前技术尚难以区分这些细胞是来自宿主鼠本身,还是经由hUCMSC。最新研究^[23,24]表明,Toll样受体(TLR)介导的激活作用对hUCMSC成骨分化能力影响不大,但在炎症因子刺激下,hUCMSC成骨分化能力可达到与BMSC相似的水平。该项研究使hUCMSC在骨再生应用方面替代BMSC成为可能。另有研究^[25]比较骨髓、脂肪组织、脐带来源的间充质细胞(hUCMSC缺少TLR4表达)TLR的抗炎能力和免疫排斥抑制能力,炎症通过上调3种间充质细胞TLR3表达

使炎症因子分泌量均增加,但上调的TLR并未对hUCMSC有进一步影响;hUCMSC对混合淋巴细胞反应(MLR)所造成的免疫排斥既不受炎症,也不受TLR上调的影响;这种特性取决于高血糖因子(HGF)过量表达。

hUCMSC成骨与成软骨分化的整合应用也是未来发展的重要方向之一。一项研究^[26]将hUCMSC分别接种到成骨或成软骨基质并将这两层基质缝合到一起(中间夹有一层未分化的hUCMSC),在多聚L-乳酸支架上培养3周;组织学研究证明,尽管hUCMSC分化在这种培养模式下受到一定限制,但这种三明治式结构能显著提高成骨基质和成软骨基质的整合度。另有研究者^[27]设计一微球体支架,从支架一侧释放TGF- β ,同时从另一侧释放BMP-2,并连续改变释放这些细胞因子的位置,结果在整个支架上可检测到钙沉积,同时在TGF- β 一侧可见番红O染色阳性区域,表明通过这种成骨与成软骨环境同时刺激的分化途径实现细胞区域化分化是可行的,相关领域的进一步研究将有益于重建完整的骨软骨组织。

另外,胶原和纤维蛋白对hUCMSC的成骨分化能力均有促进作用,纤维蛋白还可促进材料降解。其中磷酸钙骨水泥-海藻盐凝胶介导的微创植入,成为研究热点^[28,29]。近期研究^[30]显示,胶原-磷酸钙骨水泥支架可以显著提高hUCMSC黏附、增殖、成骨分化能力,胶原增加材料抗负荷能力;经过8d培养,流式细胞仪分析显示hUCMSC在含8%胶原的支架上的细胞密度($1056\text{ mm}^2 \pm 65\text{ mm}^2$)高于不含胶原-磷酸钙骨水泥的对照组($645\text{ mm}^2 \pm 60\text{ mm}^2$),且细胞中检测到的肌动蛋白纤维是对照组的2倍,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)分析显示成骨基因得到更高表达,茜红素染色表明其矿化作用更强。

另一项研究^[31]中分别用海藻盐微球(A组)、氧化海藻盐微球(B组)和氧化纤维蛋白-海藻盐微球(C组)包裹hUCMSC并体外培养21d,结果发现C组材料降解最早(4d),活细胞密度最高(分别为A组和B组的4倍和15倍),ALP、骨钙素、I型胶原基因和Runx2表达均有增加。

总之,hUCMSC成骨细胞分化与hBMSC相似,即Runx2和TAZ基因活化,骨钙蛋白、骨桥蛋白合成上调,最终导致矿化作用。一些研究正在寻找不依赖胎牛血清(FBS)的培养办法^[32,33]。hUCMSC成骨分化能力在现有培养方法下低于hBMSC,但诸多优势使其仍有着广泛的应用前景。

3 hUCMSC 成肌分化机制研究

干细胞治疗被认为是治愈进行性肌营养不良等肌肉疾病的重要方向。目前的hUCMSC成肌分化技术包括在成肌基质中培养^[34]、基因转染^[35]、共同培养以及直接注射^[36,37]等。把hUCMSC放入含有5-氮杂胞苷培养基中7~11d,可观察到成肌调节因子Myf5和MyoD表达^[34]。将hUCMSC注射到受损伤肌肉中,通过免疫荧光技术和横纹肌原肌凝蛋白抗体可观察到其分化为骨骼肌;将转录因子MyoD转染进hUCMSC5d后,hUCMSC可合成与融合机制相关的表面功能标记分子、肌细胞特异性结构蛋白和肌细胞特异性酶^[35]。把hUCMSC移植到肌

营养不良小鼠模型肌组织,肢带型肌营养不良蛋白 dysferlin 和人肌营养不良蛋白表达水平显示,其分化程度要小于人脂肪组织源性基质细胞(ADSC)^[36],其原因可能是 hUCMSC 和 ADSC 的生态位差别。在将 hUCMSC 引入肌系统治疗之前,解决其分化问题将是现有研究的重点。

4 结语

hUCMSC 凭借其材料易得、广泛可用性、无侵入式增殖、良好的体外扩增能力、体内多种细胞谱系分化能力以及良好的体外扩增能力,证明作为真正治疗性细胞的潜能。近年有关 hUCMSC 在骨肌系统构建中应用的体内和体外研究均取得长足进展,然而在临床应用前仍需更多基于大型动物模型体内组织构建的实验研究,主要着眼于细胞培养环境的优化、培养支架的设计以及体内细胞组织再生能力的评估等。

参考文献

- Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair; 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study[J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(5):947-955.
- Karahuseynoglu S, Cinar O, Kilic E, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma; in situ and in vitro surveys[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(2): 319-331.
- Struys T, Moreels M, Martens W, et al. Ultrastructural and immunocytochemical analysis of multilineage differentiated human dental pulp- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells[J]. *Cells Tissues Organs*, 2011, 198(6):366-378.
- Arufe MC, de la Fuente A, Mateos J, et al. Analysis of the chondrogenic potential and secretome of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord stroma[J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(7):1199-1212.
- Caballero M, Reed CR, Madan G, et al. Osteoinduction in umbilical cord- and palate periosteum-derived mesenchymal stem cells[J]. *Ann Plast Surg*, 2010, 64(5):605-609.
- de Bruyn C, Najar M, Raicevic G, et al. A rapid, simple, and reproducible method for the isolation of mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly without enzymatic treatment[J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(3):547-557.
- Chen HC, Lee YS, Steber M, et al. MicroRNA and messenger RNA analyses of mesenchymal stem cells derived from teeth and the Wharton jelly of umbilical cord[J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(6):911-922.
- Fong CY, Richards M, Manasi N, et al. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly[J]. *Reprod Biomed Online*, 2007, 15(6):708-718.
- Bailey MM, Wang L, Bode CJ, et al. A comparison of human umbilical cord matrix stem cells and temporomandibular joint condylar chondrocytes for tissue engineering temporomandibular joint condylar cartilage[J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(8):2003-2010.
- Ciavarella S, Dammacco F, de Matteo M, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells: role of regulatory genes in their differentiation to osteoblasts[J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(8):1211-1220.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(7):1330-1337.
- Wang L, Tran I, Seshareddy K, et al. A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(8):2259-2266.
- Cheng H, Qiu L, Ma J, et al. Replicative senescence of human bone marrow and umbilical cord derived mesenchymal stem cells and their differentiation to adipocytes and osteoblasts[J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(8):5161-5168.
- Kuo HC, Chiu CC, Chang WC, et al. Use of proteomic differential displays to assess functional discrepancies and adjustments of human bone marrow- and Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(3): 1305-1315.
- Hsieh JY, Fu YS, Chang SJ, et al. Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord[J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(12):1895-1910.
- Singh M, Sandhu B, Scurto A, et al. Microsphere-based scaffolds for cartilage

- tissue engineering: using subcritical CO₂ as a sintering agent[J]. *Acta Biomater*, 2010, 6(1):137-143.
- Wang L, Seshareddy K, Weiss ML, et al. Effect of initial seeding density on human umbilical cord mesenchymal stromal cells for fibrocartilage tissue engineering[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(5):1009-1017.
- Zhao L, Tang M, Weir MD, et al. Osteogenic media and rhBMP-2-induced differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells encapsulated in alginate microbeads and integrated in an injectable calcium phosphate-chitosan fibrous scaffold[J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(7-8):969-979.
- Gong W, Han Z, Zhao H, et al. Banking human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for clinical use[J]. *Cell Transplant*, 2012, 21(1):207-216.
- Zhang ZY, Teoh SH, Chong MS, et al. Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(1):126-131.
- Wang L, Dormer NH, Bonewald LF, et al. Osteogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stromal cells in polyglycolic acid scaffolds[J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(6):1937-1948.
- Diao Y, Ma Q, Cui F, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: osteogenesis in vivo as seed cells for bone tissue engineering[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2009, 91(1):123-131.
- Raicevic G, Najar M, Pieters K, et al. Inflammation and Toll-like receptor ligation differentially affect the osteogenic potential of human mesenchymal stromal cells depending on their tissue origin[J]. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18(13-14):1410-1418.
- Kikuchi-Taura A, Taguchi A, Kanda T, et al. Human umbilical cord provides a significant source of unexpanded mesenchymal stromal cells[J]. *Cytotherapy*, 2012, 14(4):441-450.
- Raicevic G, Najar M, Stamatopoulos B, et al. The source of human mesenchymal stromal cells influences their TLR profile as well as their functional properties[J]. *Cell Immunol*, 2011, 270(2):207-216.
- Wang L, Zhao L, Detamore MS. Human umbilical cord mesenchymal stromal cells in a sandwich approach for osteochondral tissue engineering[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2010, 5(9):712-721.
- Dormer NH, Singh M, Wang L, et al. Osteochondral interface tissue engineering using macroscopic gradients of bioactive signals[J]. *Ann Biomed Eng*, 2010, 38(6):2167-2182.
- Zhao L, Weir MD, Xu HH. An injectable calcium phosphate-alginate hydrogel-umbilical cord mesenchymal stem cell paste for bone tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(25):6502-6510.
- Zhao L, Weir MD, Xu HH. Human umbilical cord stem cell encapsulation in calcium phosphate scaffolds for bone engineering[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(14): 3848-3857.
- Thein-Han W, Xu HH. Collagen-calcium phosphate cement scaffolds seeded with umbilical cord stem cells for bone tissue engineering[J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(23-24):2943-2954.
- Zhou H, Xu HH. The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(30): 7503-7513.
- Hartmann I, Hollweck T, Haffner S, et al. Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells grow best under GMP-compliant culture conditions and maintain their phenotypic and functional properties[J]. *J Immunol Methods*, 2010, 363(1):80-89.
- Girdlestone J, Limbani VA, Cutler AJ, et al. Efficient expansion of mesenchymal stromal cells from umbilical cord under low serum conditions[J]. *Cytotherapy*, 2009, 11(6):738-748.
- Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, et al. CD105⁺ cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential[J]. *Int J Mol Med*, 2006, 18(6):1089-1096.
- Kocafe C, Balci D, Hayta BB, et al. Reprogramming of human umbilical cord stromal mesenchymal stem cells for myogenic differentiation and muscle repair [J]. *Stem Cell Rev*, 2010, 6(4):512-522.
- Vieira NM, Zucconi E, Bueno CR Jr, et al. Human multipotent mesenchymal stromal cells from distinct sources show different in vivo potential to differentiate into muscle cells when injected in dystrophic mice[J]. *Stem Cell Rev*, 2010, 6(4):560-566.
- Zucconi E, Vieira NM, Bueno CR Jr, et al. Preclinical studies with umbilical cord mesenchymal stromal cells in different animal models for muscular dystrophy[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011:715251.

(收稿:2012-12-03;修回:2012-12-15)

(本文编辑:秋实)